

**VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG PARTIELL INAKTIVIERTER BIOLOGISCH  
AKTIVER BIOPOLYMERE**

**Publication number:** DD262042  
**Publication date:** 1988-11-16  
**Inventor:** PFUELLER UWE (DD); FRANZ HARTMUT (DD)  
**Applicant:** STAATLICHES INST FUER IMMUNPRA (DD)  
**Classification:**  
- **international:** *C12P19/00; C12P21/00; C12P19/00; C12P21/00;*  
(IPC1-7): C12P21/00; C12P19/00  
- **european:**  
**Application number:** DD19870304934 19870714  
**Priority number(s):** DD19870304934 19870714

[Report a data error here](#)

Abstract not available for DD262042

---

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

**VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG PARTIELL INAKTIVIERTER BIOLOGISCH  
AKTIVER BIOPOLYMERE**Legal status (INPADOC) of **DD262042**

<b>DD F</b>	<b>30493487 A</b>	(Patent of invention)
<b>PRS Date :</b>	2001/02/01	
<b>PRS Code :</b>	ENJ	
<b>Code Expl.:</b>	- CEASED DUE TO NON-PAYMENT OF RENEWAL FEE	



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **262 042 A1**4(51) C 12 P 21/00  
C 12 P 19/00

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 304 934 7

(22) 14.07.87

(44) 16.11.88

(71) Staatliches Institut für Immunpräparate und Nährmedien, Klement-Gottwald-Allee 317/321, Berlin, 1120, DD

(72) Pfüller, Uwe, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Franz, Hartmut, Prof. Dr. med. Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung partiell inaktivierter biologisch aktiver Biopolymere

(55) Biopolymere, Lectine, bakterielle Toxine, pharmazeutische Industrie, biochemische Analytik, medizinische Diagnostik, Ethylammoniumnitrat, Butylammoniumthiocyanat

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung partiell inaktivierter biologisch-aktiver Biopolymerer wie z. B. Lectinen oder bakteriellen Toxinen. Anwendungsgebiete sind die pharmazeutische Industrie, die biochemische Analytik und die medizinische Diagnostik. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß die biologisch aktiven Biopolymere durch kurzzeitige Behandlung mit geschmolzenen Salzen bei  $-10$  bis  $+40^{\circ}\text{C}$ , gegebenenfalls unter Zusatz von Wasser, anderen Lösungsmitteln und/oder Denaturierungsmitteln partiell inaktiviert werden. Eine bevorzugte Variante ist die Umsetzung mit Ethylammoniumnitrat oder Butylammoniumthiocyanat bei Raumtemperatur.

## Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung partiell inaktivierter, biologisch aktiver Biopolymerer, wie Lectinen oder bakteriellen Toxinen, **dadurch gekennzeichnet**, daß diese Verbindungen bei  $-10$  bis  $+40^{\circ}\text{C}$  kurzzeitig mit geschmolzenen Salzen, gegebenenfalls unter Zusatz von Wasser, anderen Lösungsmitteln und/oder Denaturierungsmitteln, behandelt und anschließend durch Verdünnen mit Pufferlösung und gegebenenfalls nachfolgender Entfernung des Salzes, der Lösungsmittel bzw. des Denaturierungsmittels isoliert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Biopolymere bei  $15-25^{\circ}\text{C}$  mit Ethylammoniumnitrat behandelt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Biopolymere bei  $15-25^{\circ}\text{C}$  mit Butylammoniumthiocyanat behandelt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Biopolymere mit Mischungen geschmolzener Salze behandelt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Biopolymere mit durch Zugabe von Wasser bei Raumtemperatur verflüssigten Salzen behandelt werden.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Biopolymere mit konzentrierten Lösungen von organischen Nitraten, wie 2-Hydroxyethylammoniumnitrat in Wasser behandelt werden.

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung partiell inaktivierter, biologisch aktiver Biopolymerer, wie z. B. Lectinen oder bakteriellen Toxinen.

Anwendungsgebiet der Erfindung sind die pharmazeutische Industrie, die biochemische Analytik, die medizinische Diagnostik und die Biotechnologie.

## Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Biologisch aktive Biopolymere, darunter Polysaccharide und Proteine sowie ihre Kombinationen mit Lipiden und anderen biologisch relevanten Substanzen gewinnen zunehmend an Interesse für die Herstellung von Arzneimitteln und speziellen Reagenzien für die biochemische Analytik und Diagnostik. Verschiedene toxische Naturstoffe, vor allem die toxischen Lectine (Olsnes, S., and Pihl, H. (1982), Toxic lectins and related proteins, in: Molecular action of toxins and viruses (P. Cohen and S. van Heyningen, eds.), Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp. 51-1054; Franz, H. (1986), Oncology 43: suppl. 1, 23-24) werden mit Erfolg für die Darstellung zielsuchender hochwirksamer Pharmaka, sogenannter Immunotoxine eingesetzt (Jansen, F. K., Blythman, H. E., Carriere, D., Casellas, P., Gros, O., Gros, P., Laurent, J. C., Paolucci, F., Pau, B., Poncelet, Ph., Richer, G., Vidai, H., and Voisin, G. A. (1982), Immunological Rev. 62, 185-216). Für diesen Anwendungszweck verfügen die toxischen Lectine wie Mistellecetin I (ML I), Ricin und Abrin neben den erwünschten cytotoxischen Eigenschaften auch über in diesem Zusammenhang störende Wirkungen auf Zellen (Vitetta, E. S. (1986), J. Immunol. 136, 1880-1887; Neville, D. M. Jr. and Youle, R. J. (1982), Immunol. Rev. 62, 75). Das gilt vor allem für die Fähigkeit dieser Lectine, sich in unerwünschter Weise auch an gesundes Gewebe und nicht nur an Tumorzellen zu binden. Deshalb ist es notwendig, für die Herstellung von Immunotoxinen Lectine einzusetzen, deren zuckerbindender Teil vorher abgespalten (Variante 1) oder durch chemische Einwirkung (Variante 2) inaktiviert wurde.

In der Literatur werden beide Möglichkeiten beschrieben und deren Nachteile aufgezeigt. Nach Variante 1 ist für die Lectinspaltung ein hoher präparativer Aufwand notwendig, und die resultierenden Immunotoxine sind in der Regel weniger wirksam als solche, die das intakte Lactin enthalten, deren selektive Bindung an Tumorgewebe jedoch gering ist (Thorpe, Ph. E. and Ross, W. C. I. (1982), Immunol. Rev. 62, 119-157). Eine Ausschaltung der Bindungsfähigkeit an Kohlenhydrate nach Variante 2 auf chemischem Wege durch selektive Inaktivierung des Lectinteils wurde trotz zahlreicher Versuche bisher nicht verwirklicht, ohne gleichzeitig erwünschte Eigenschaften zu stören (Sandvig, K., Olsnes, S. and Pihl, A. (1978), Eur. J. Chem. 84, 323-331; Thorpe, Ph. E., Detre, S. I., Foxwell, B. M. J., Brown, A. N. F., Skilleter, D. N., Wilson, G., Forrester, J. A. and Stürpe, F. (1985), Eur. J. Biochem. 147, 197-206).

## Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, biologisch aktive Biopolymere, wie Lectine oder bakterielle Toxine partiell zu inaktivieren. Sie hat insbesondere das Ziel, die Zuckerbindungsfähigkeit toxischer Lectine ohne Anwendung von chemischen Spaltungs- bzw. Modifizierungsreaktionen zu beseitigen.

## Darlegung des Wesens der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß die biologisch aktiven Biopolymere durch kurzzeitige Behandlung mit geschmolzenen Salzen bei  $-10$  bis  $+40^{\circ}\text{C}$ , gegebenenfalls unter Zusatz von Wasser, anderen Lösungsmitteln und/oder Denaturierungsmitteln, partiell inaktiviert werden. Zur Inaktivierung genügt ein Zeitraum von 5–60 Minuten. Anschließend wird mit Pufferlösung verdünnt und das Biopolymere, gegebenenfalls nach Entfernen des Salzes, der Lösungsmittel bzw. des Denaturierungsmittels, isoliert.

Die Erfindung wird nachfolgend am Beispiel toxischer Lectine näher erläutert. Als geschmolzene Salze zur Inaktivierung solcher Lectine eignen sich bevorzugt die bei Raumtemperatur flüssigen Verbindungen Ethylammoniumnitrat und Butylammoniumthiocyanat. Sie ermöglichen die Durchführung der erfindungsgemäßen Umsetzung bei Raumtemperatur und damit unter günstigen Bedingungen. Die beiden Salze können auch im Gemisch bzw. auch im Gemisch mit jeweils einem anderen geeigneten Salz verwendet werden. Ist das eingesetzte Salz bei Zimmertemperatur fest, dann muß Wasser oder ein anderes Lösungsmittel wie z. B. Alkohol in der notwendigen Menge zugesetzt werden. So läßt sich die erfindungsgemäße Umsetzung z. B. auch mit konzentrierten Lösungen von organischen Nitraten wie 2-Hydroxyethylammoniumnitrat in Wasser realisieren. In manchen Fällen ist es vorteilhaft, ein weiteres Denaturierungsmittel zuzusetzen. Hierfür kommen vor allem Harnstoff, Guanidinhydrochlorid und Tenside in Betracht. Die Isolierung des Lectins erfolgt zweckmäßigerweise nach Entfernung der im Gemisch vorhandenen Stoffe, wofür sich Verdünnen, Dialyse und/oder Gelfiltration anbieten.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es erstmals möglich, biologisch aktive Biopolymere auf schonende Weise partiell zu inaktivieren. Speziell kann die Zuckerbindungsfähigkeit toxischer Lectine in vollem Umfang ausgeschaltet werden, ohne daß die erwünschten cytotoxischen und anderen Eigenschaften beeinträchtigt werden (vgl. Tabelle 1). Ein Vorteil des Verfahrens besteht ferner darin, daß die eingesetzten Salze nicht toxisch, sehr leicht und festlos abtrennbar, stabil, preiswert und mit in der Biochemie gebräuchlichen Lösungsmitteln mischbar sind.

In Tabelle 1 sind von nativen und den erfindungsgemäß denaturierten Lectinen am Beispiel des Mistlectins I (ML I) Angaben zur Löslichkeit, Kohlenhydratbindungsfähigkeit, Toxizität und Fähigkeit zur Proteinsynthesehemmung im zellfreien Milieu aufgeführt.

**Tabelle 1**

Eigenschaften von ML I und partiell inaktiviertem ML I nach Behandlung mit Ethylammoniumnitrat EAN\*.

	ML I	ML I (inaktiviert)
Löslichkeit (mg/ml Puffer: PBS-Imidazol, pH 7,8)	1,2–1,6	0,6–1
Stabilität bei c = 1 mg/ml	stabil	4–10 Tage
2 + 0,5 mg/ml	stabil	ca. 1 Monat
2 + 0,1 mg/ml	stabil	ca. 6 Monate
Toxizität (pro Maus) in ng	ca. 800	ca. 60 000
Bindungskapazität an Lactosyl -Sepharose <sup>a</sup> in mg/ml Gel	1	0,01
Präzipitierbarkeit durch Con A	+++	+++(+)
Agglutinationstiter (1 % gewaschene Erythrocyten vom Schaf)	1:280	0
Cytotoxizität (ng/2 × 10 <sup>4</sup> Ehrlich's Ascites-Zellen)	ca. 15 ng	ca. 20 000

\* Literatur zu Ethylammoniumnitrat: D. F. Evans u. A. Yamauchi (1982), J. Colloid Interface Sci. 88, 89–96.

Die Erfindung soll nachfolgend an Beispielen näher erläutert werden.

### Beispiele

#### Beispiel 1

Partielle Inaktivierung toxischer Lectine am Beispiel ML I: 50 mg Lectin werden unter intensivem Rühren zu 25 ml Ethylammoniumnitrat (Wassergehalt < 10%, frei von Nitrit und anderen Verunreinigungen, gewünschter pH-Wert mit Ethylamin eingestellt) bei Raumtemperatur hinzugefügt. Ein Zusammenballen des lyophilisierten Proteins ist durch rasche feinste Verteilung zu vermeiden. Ist nach 5 min die Substanz nicht vollständig gelöst, so werden anteilweise maximal 2,5 ml Wasser addiert. Innerhalb von weiteren 5 min tritt klare Lösung ein. Die Lösung wird insgesamt 5–30 min stehen gelassen und dann in 475 ml PBS, deren pH mit Imidazol auf 7,8–8 eingestellt wurde, langsam einfließen lassen. Anschließend wird gegen Wasser oder PBS zur Entfernung von Ethylammoniumnitrat dialysiert und durch Membranfiltration auf einen Gehalt von 0,5 bis maximal 0,8 mg denaturiertes Protein/ml eingestellt.

#### Beispiel 2

5 mg Lectin werden, wie unter Beispiel 1 beschrieben, in 5 ml 2-Hydroxyethylammoniumnitrat (erhalten durch Verflüssigung des Salzes mit ca. 20 % Wasser, gegebenenfalls unter Zusatz von EAN) gelöst. Die Lösung wird wie unter 1 behandelt, 30 min gerührt und wie beschrieben aufgearbeitet. Die nach der Dialyse erhaltene Proteinlösung kann bis zu einem Proteingehalt von 0,9 mg/ml aufkonzentriert werden.

**Beispiel 3**

5mg Lectin werden in 3ml EAN, das 0,2ml Wasser und 0,2-1 g Guanidinhydrochlorid enthält, gelöst. Nach 5-10 min wird, wie unter Beispiel 1 beschrieben, aufgearbeitet. Die dialysierte Lösung des partiell inaktivierten Lectins kann bis zu einer Konzentration von 0,7-0,8mg/ml Pufferlösung aufkonzentriert werden.

---